高品質小花蕙蘭生產體系建構之研究

陳威臣[1]、黃晉興[2]、林毓雯[3]、陳季呈[4]、陳金枝[2]、石信德[2]、
曹進義[1]、夏奇鈮[1]、謝廷芳[5]

摘　　要

小花蕙蘭 (國蘭) 每年外銷金額可達2~3億元新臺幣，是金額僅次於蝴蝶蘭之外銷蘭花，商品以平價蘭為主，主要銷往韓國、日本、新加坡及香港等地。近年來國蘭栽培面積雖快速擴充，但達外銷標準之產品率偏低，以致於出口貨源不足。探究其原因可為下列幾點：1. 慣行栽培以分芽繁殖為主，繁殖倍率低，大量栽種時蘭苗供應不敷使用；2. 蕙蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*，CymMV) 及齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*，ORSV) 為小花蕙蘭主要之病毒，以及具寄主專一性-尖鐮孢菌 (*Fusarium oxysporum*)所引起之假球莖腐敗病，此三種病害傳播途徑均為帶菌之種苗，而分芽繁殖方式導致病毒病及假球莖腐敗病迅速擴散，以致栽培管理不易。3. 目前多數蘭農採用雙層遮蔭網室，此種設施由於無法防雨，因此導致病害難以控制。上述小花蕙蘭繁殖方法與栽培的缺失必須加以克服，才能提供生育整齊、生理一致與栽培管理便利達到外銷需求標準之商品，因此建立小花蕙蘭健康種苗供應系統與開發病害檢測方法以利種苗健康管理實屬必要。本團隊針對四季類 (*Cymbidium ensifolium*) 與報歲類 (*Cymbidium sinense*) 小花蕙蘭種苗進行組織培養大量繁殖、出瓶馴化與肥培管理技術目前已有初步成果；針對兩種主要病毒病害亦已研發血清檢測與生物晶片兩種偵測方法，以及利用RT-PCR方式檢測尖鐮孢菌之感染。試驗結果顯示，利用健康種苗進行栽培能大幅度降低種苗帶病之機率，主要病害檢測方法之建立則有助於健康栽培管理。本團隊後續擬以(1)組織培養種苗生產及其肥培管理；(2)設施栽培管理與病害控制；(3)建構國蘭健康種苗供應中心等三項主題為主要研究目標。利用整合組培苗繁殖栽培技術、病害檢測技術與管理策略，並配合育種家、蘭農與貿易商的觀點選擇適當商業栽培品種，建立高效率小花蕙蘭生產模式，大量生產符合外銷需求之高品質小花蕙蘭成株商品。

關鍵詞：小花蕙蘭、組織培養、肥培管理、病害檢測、健康種苗

[1] 農業試驗所 生技組；通訊作者，E-mail: UCCChen@tari.gov.tw
[2] 農業試驗所 植病組
[3] 農業試驗所 農化組
[4] 花蓮改良場 蘭陽分場
[5] 農業試驗所 花卉中心

前　　言

小花蕙蘭 (又稱國蘭) (Chinese Cymbidium) 為蘭科 (Orchidaceae)、蕙蘭屬 (*Cybidium* spp.) 多年生草本植物，除姿態優雅其花朵具有淡雅幽香外，其花藝及葉藝的表現也極具觀賞價值，為具有潛力的觀花、觀葉及香花植物。國蘭主要包含四季蘭、報歲蘭、春蘭、春劍、九華蘭、寒蘭等六類；原生於臺灣中低海拔山區、中國長江流域以南、日本及韓國等地，屬於小型地生蘭類。國蘭每年外銷金額達2-3億元新臺幣，為金額僅次於蝴蝶蘭之外銷蘭花，外銷品種以平價蘭為主，主要銷往韓國、日本、新加坡及香港等地。臺灣早期小花蕙蘭以山採品居多，歷經工商業高度發展及長年濫採，目前在山區已不易發現野生植株。近年來，臺灣栽培小花蕙蘭技術純熟且品質優良，深受國內外市場喜愛，傳統分株法生產效率欠佳已不敷市場需求，導致供貨品質不穩定。

目前慣行栽培以母株分芽繁殖，繁殖倍率極低；為提供穩定且品質良好之小花蕙蘭種苗，且為了維持生長整齊、生理一致與栽培管理方便以達外銷需求，建立組織培養大量繁殖種苗方式實屬必要。目前蘭農對於國蘭組培苗管理大都較無經驗，亟需建立一套小花蕙蘭組培苗養成與管理技術；而一般業者認為栽培組培苗耗時甚久，故在出瓶前的整齊度，及出瓶後設施內的馴化與栽培流程有待研發，以達縮短養苗時間的目標。國蘭栽培過程常受到病毒病感染，影響敏感性品種之生育與品質特別明顯，尤其病毒病無法在事後治療，須以預防方式面對才是根本之道。傳統上國蘭的繁殖以無性分芽方式為主，若母株感染病毒，其子代芽體都帶有病毒，因而影響生育及品質；因此，重視母本保護以免於病毒感染是相當重要的措施。現有無防雨之雙層遮蔭設施易造成疫病、炭疽病、灰黴病等病害難以控制，又慣行分芽繁殖易帶假球莖腐敗病菌，為求符合外銷國蘭需求，亟需建立病害檢測與管理方式，已達健康種苗生產之目的。近年來，小花蕙蘭產能雖然擴充迅速，但是達到外銷品質標準之產品率低，以致貨源往往不足，亟需建立完善之栽培管理及病害防治模式，並規劃適於栽培符合外銷國蘭需求之設施。國蘭栽培之設施除傳統雙層遮蔭網設施外，也利用在遮蔭網外搭建塑膠布或浪板等防雨設施，更有業者利用透光材料建構屋頂與牆壁之溫室進行栽培，惟後兩種設施栽培業者極為少數且面積不大，而一般蘭農對國蘭防雨設施管理較無經驗，因此需儘速建立其栽培管理體系以供應用。

本團隊已建立小花蕙蘭組培大量繁殖種苗與馴化方式、病毒及尖鐮孢菌的檢測技術與管理方法；本團隊後續將針對組織培養種苗生產與養成管理，以及防雨設施栽培管理與病害控制，用以建構符合外銷國蘭之健康種苗供應中心為主要目標。

組織培養種苗大量繁殖系統

自組織培養未熟胚 (immature embryo) 無菌播種技術發展以來，已可獲得國蘭種苗的大量繁殖，未熟胚經無菌播種後發芽可形成俗稱龍根之根莖 (rhizome)，再由根莖誘導芽體 (葉芽) 形成。小花蕙蘭組培多是以根莖形成芽體的路徑來達到量化需求，而根莖可由無菌播種、頂芽、側芽或花芽培養而來；而後葉芽生長成為帶根苗，待苗株達5-7 cm時即可移出瓶外馴化，存活後栽培約2-3年可長成開花株，子代與親本外觀無異即具有商業價值。本團隊雖已完成小花蕙蘭組培繁殖各階段培養方法，然而芽體無菌化技術、根莖與瓶苗品質維持與出瓶存活率等效率仍有待提升；此外，組培大量繁殖流程制定與組培苗養成也是研究重點，上述問題均是小花蕙蘭組織培養苗是否成功的關鍵所在。

本團隊利用市售四季蘭玉華開花授粉所得果莢 (圖一A、一B)，進行未熟胚播種所獲得之根莖，進行組培苗大量繁殖體系之建立，研發提昇組培苗馴化存活率，以及縮短組培苗馴化時程 (或幼年期) 相關技術。大量繁殖種苗技術操作流程簡述如下：

1. 無菌培植體建立：無菌播種係利用玉華國蘭人為授粉約6-7個月後之未開裂果莢，進行未熟胚 (immature embryo) 無菌播種，約經過6-7個月的培養後，可獲得多數無菌根莖 (圖一C)；而後將根莖繼代培養於根莖生長培養基，待根莖直徑達2-3 mm後再進行後續試驗。芽體無菌化流程與上述無菌播種類似，將長約10 cm新生芽體以酒精棉擦拭表面，於無菌操作臺內利用NaOCl溶液除菌後再經無菌水清洗3-4次，切取假球莖基部腋芽培養於芽體誘導培養基，經培養約4-6週後腋芽逐漸萌發生長，可建立玉華國蘭瓶苗無菌培養。
2. 根莖的生長及增殖：取長約1.5-2 cm之根莖培養於含有適量NAA及Peptone組合的固態培養基，接種後將材料置於25±1℃之恆溫、黑暗環境下培養。結果顯示，可大量繁殖生長良好之粗狀根莖 (圖一D)。
3. 芽體誘導：將長約1.5-2 cm之粗壯根莖 (直徑約2-3 mm) 培養於含有適量BA、NAA 與椰子汁組合之MS花寶固態或液態培養基，接種後將材料分別置於25±1℃之恆溫且光照培養。結果顯示，液態培養 (圖 一E) 較固態培養具有較佳的芽體誘導效果。
4. 小苗生長與增殖：將已形成芽體 (約3-5 mm) 根莖培植體繼代培養於含有適量BA、NAA與香蕉泥組合之MS花寶固態培養基，結果顯示上述根莖培植體培養於適當培養基後，培植體上之小芽體可持續生長，形成大量小苗 (圖一F)。此外，取苗長約2-3 cm小苗繼代培養於含有適量BA、NAA與香蕉泥組合之MS花寶固態培養基，可以促使小苗生長，而後在小苗基部萌發小芽體，可形成芽長芽的大量繁殖模式 (圖一G)。
5. 小苗發根與馴化：取苗長約2-3 cm小苗繼代培養於含有適量BA、NAA 與香蕉泥組合之花寶固態培養基，培養6-8個月後可促使小苗生長健壯且長出健壯根

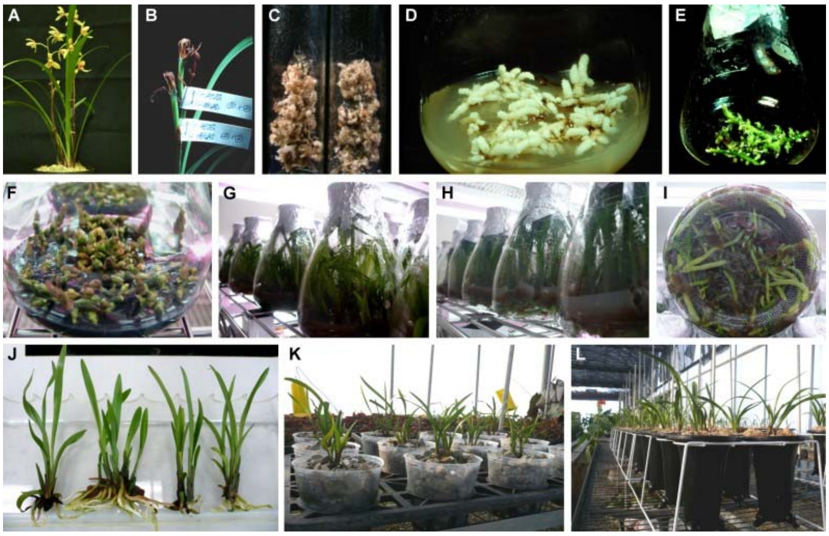
(圖一H、一I)。馴化處理係將上述已發根之玉華國蘭瓶苗 (高約10 cm) 出瓶，用水洗淨根部附著之培養基 (圖一J)，利用濕潤水苔作為介質，在防雨遮陰溫網室環境進行馴化處理，馴化初期應注意保濕以避免組培幼苗枯死，但在適當時間 (約2個月) 需要更換至碎石與蛇木屑之混合介質栽培 (圖一K)，爾後則可依一般栽培管理方式進行 (圖一L)。

本團隊同時就其他種類 (如四季蘭-金荷、報歲蘭-中斑藝類與報歲蘭-桑原晃) 進行研究，試驗係以未熟胚無菌播種所得根莖作為芽體誘導材料。試驗結果簡述如下：

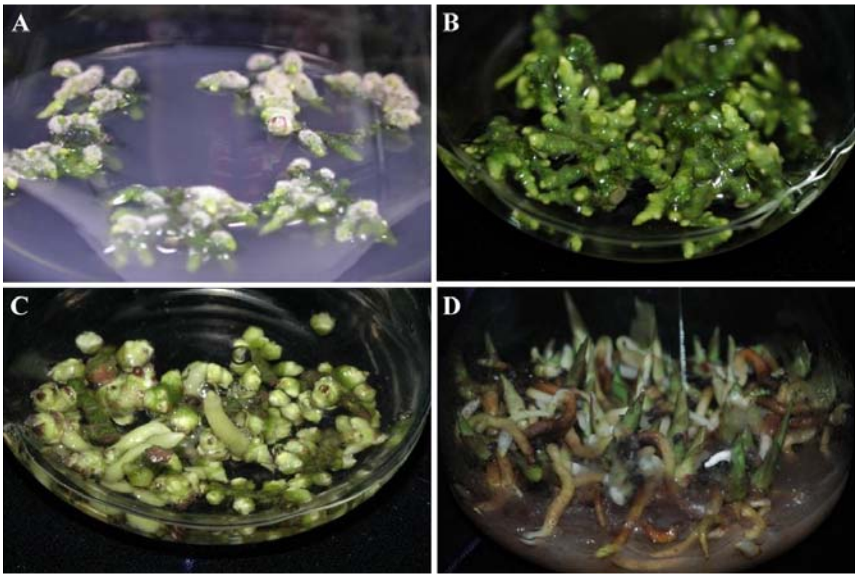
1. 根莖發育：高基鹽類、中高蔗糖濃度、auxins 及有機添加物的處理均有助於蕙蘭之根莖生育，其中以添加有機物對根莖生育促進效果最為顯著，鮮重增加率高達約 3 倍，其根莖外觀較粗，有利於芽體分化；auxins 亦有助於根莖發育，根莖液態培養結果顯示，1 g/L NAA 或 IBA 處理促進根莖生育的效果顯著較佳，且繁殖效率也較為快速，約為固態培養之 2 倍 (圖二 A-二 B)。
2. 芽體誘導：cytokinins、椰子水均可促進根莖分化為芽體，利用低濃度 cytokinins 搭配低濃度 NAA 組合處理 (0-5 mg/L NAA、BA) 及椰子水 (0-100 ml/L)，在液態方式培養 12 週後，每段 1-1.5 公分根莖可誘導約 1.4 個有根芽體及 6-7 個無根芽體效果最佳；但若以高濃度 cytokinins 處理根莖時，易使培植體褐化而不利芽體形成，嚴重者甚至死亡。比較 cytokinins 之處理效果，TDZ 誘導芽體形成之結果較 BA 顯著，然而觀察其後續生長情形結果顯示，高濃度 TDZ 處理之芽球後續生育較為緩慢，而以低濃度 TDZ 或 BA 處理之芽體抽長情形較好 (圖二 C)。
3. 芽體生長：若將已長根芽體或直徑超過 3 mm 以上芽球切下單獨培養時，不但未見芽體抽長且多會逆分化為根莖，若以整段帶芽體或芽球之根莖進行培養時，其芽體抽長情形較佳。進一步試驗結果顯示，每段根莖帶 3 芽之處理其芽體增殖較多，在適當培養基組成條件下，每瓶 10 個根莖之總芽數可達 65 個芽體為最多，且芽體生育與抽長情形最為良好；而每段根莖帶 5 芽之處理表現最差，其總芽數僅約 35 個，且約 5%培植體發生褐化現象。芽體抽長試驗結果顯示，有機添加物處理以馬鈴薯搭配香蕉泥較椰子水處理好，然而蔗糖濃度過高時，芽體卻只是誘導發根，而芽體生長卻受到抑制 (圖二 D)。

肥培管理

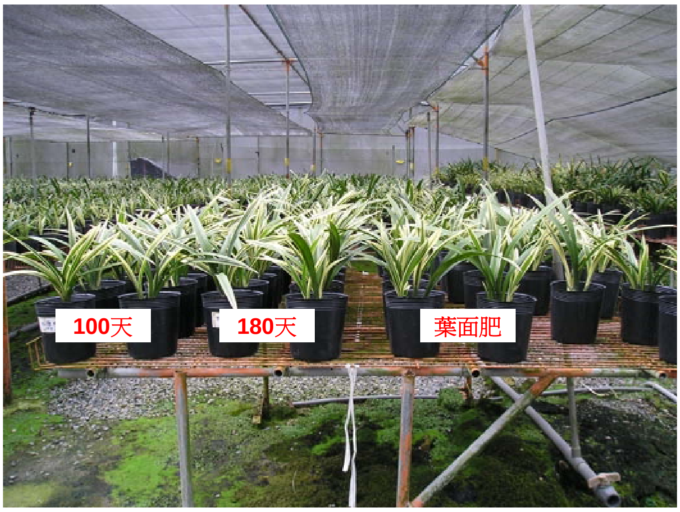
小花蕙蘭栽培介質主要係以碎石、蛇木屑、發泡煉石、花生殼、水苔等粗鬆資材為主，這些介質通常養分含量極低，因此肥料的養分供應能力對產品品質及產量影響極大。目前以商品化有機肥、緩效化學肥或液體化學肥為主，有機肥料養分釋放特性隨原料及製程而異，緩效化學肥及液體化學肥則配方固定，但是都無法配合各種氣候或全生育期之所需。養液耕 (hydroponic production) 為非土耕



圖一、小花蕙蘭（四季蘭-玉華）無菌播種組培苗大量繁殖與馴化情形。



圖二、小花蕙蘭（四季蘭-金荷）無菌播種組培苗大量繁殖情形。



圖三、緩效肥與葉面肥處理對小花蕙蘭（報歲蘭-太平洋）植株生長影響情形。

栽培之主要方式，具有可配合作物生育期及氣候變化靈活調整配方之優點，發展至今已有許多養液配方應用於不同作物，然這些配方多為歐美等溫帶國家所開發，對於位處熱帶及亞熱帶交界的臺灣地區作物栽培並不適用。

本團隊針對矮化劑處理之傳統拆芽苗 (報歲蘭-太平洋) 進行養液葉面噴施 (配方如表一) 試驗，結果顯示新芽生長前期，葉面肥處理與緩效肥處理葉長差異不顯著；至於生育中後期，為配合外銷市場植株規格不宜過大 (30公分以內)，大幅調降葉面肥氮素含量濃度，處理3個月後 (11月下旬調查)，葉面肥處理之葉長均在控制規格內，均勻度亦優於緩效肥處理 (表二)，且以目視觀察可感覺處理組植株葉片較對照組挺直 (圖一)，利用手指觸摸亦可感覺處理組植株葉片較為硬挺。整體而言，養液氮素含量越高則植株生長越快，養液氮含量適當而鉀氮含量比值越高則葉厚增加。

後續增加以堆肥為對照之試驗，並以短期緩效肥 (100天期) 搭配低頻度低氮高鉀葉面肥 (配方如表三之6月上旬)，以解決雨季葉面肥施作問題，結果顯示在處理5個月後 (11月上旬調查)，葉長表現以緩效肥處理較佳，與葉面肥及對照處理差異均達5%顯著水準；葉寬表現則以葉面肥較佳，但與其它處理間差異不顯著；根數則以緩效肥100天表現較佳，但各處理間差異不顯著 (表四)。由於葉面肥處理之葉長顯著低於市售緩效肥處理，顯示雨季以低氮高鉀葉面肥搭配緩效肥之處理，明顯減緩植株生長，推測其原因可能為緩效肥施用後，需經一定時間其肥料養分方可釋出，因此有必要在進入雨季前即提早施用，以免造成養分供應空窗期。

整體而言，蕙蘭養分供應可簡單分為苗期、營養生長期、開花期。苗期栽培僅須少量肥料，肥料過量易致生育不良或肥傷。營養生長期當以較高比率之氮肥為主，以生產足量的枝條及葉面積。開花期則應適度將氮肥降低，提高鉀肥，因此時若氮素過多，枝葉過度繁茂將對開花不利。緩效肥與有機肥具有施用方便及省工等優點，葉面養液肥施用則具有靈活調整配方與肥效反應快速之優點。然在雨季連續陰雨時，葉面肥的噴施效果常受影響，故於梅雨及颱風季節，應考慮利用防雨設施，或調整短天期緩效肥搭配低頻度低氮高鉀葉面肥之施用方式，以解決雨季葉面肥料施作不易及肥效低下的問題。後續研究將利用組培苗作為試驗材料，以前期成果為參考依據，進行肥培處理對小花蕙蘭組培苗生長之影響探討，期能歸納一個有效之肥培管理方式以利小花蕙蘭栽培農民之應用。

表一、試區水質及不同時期養液三要素配方濃度表 (mg / kg)

肥料含量	水質	3 月 下旬	6 月 下旬	8 月 下旬
氮 (N)	4.60	200	150	80
磷 (P)	N.D.	50	60	60
鉀 (K)	0.93	360	375	400

表二、蕙蘭生育調查統計表

處　　理	100 天期	180 天期	葉面肥	100 天期	180 天期	葉面肥
	葉長 (cm)			葉寬 (cm)		
8 月 上旬						
平均值	15.2 [a*]	16.4 [a]	16.2 [a]	- [**]	-	-
變異係數	0.23	0.14	0.12	-	-	-
10 月 中旬						
平均值	26.4 [a]	27.3 [a]	24.0 [b]	2.30 [a]	2.31 [a]	2.30 [a]
變異係數	0.15	0.14	0.11	0.05	0.06	0.05
11 月 下旬						
平均值	33.2 [a]	31.9 [a]	27.2 [b]	2.33 [a]	2.35 [a]	2.34 [a]
變異係數	0.10	0.11	0.09	0.05	0.06	0.05

* 相同英文字母表示差異未達 5%顯著水準

** 8 月 4 日葉片尚未完全展開，未調查葉寬

表三、試區水質及不同時期養液三要素配方濃度表 (mg / kg)

肥料含量	水質	4 月 上旬	6 月 上旬	10 月 中旬	11 月 下旬
氮 (N)	4.60	200	20	100	200
磷 (P)	N.D.	60	50	50	60
鉀 (K)	0.93	300	300	300	360

表四、緩效肥與葉面肥處理對小花蕙蘭植株生長之影響

肥料試驗處理	葉長 (cm)	葉寬 (cm)	根數
緩效肥 (180 天期)	24.8 ± 3.7 [a*]	2.07 ± 0.22 [a]	9.8 ± 3.2 [a]
緩效肥 (100 天期)	24.0 ± 3.8 [a]	2.09 ± 0.24 [a]	10.7 ± 4.1 [a]
葉面肥	20.7 ± 3.5 [b]	2.15 ± 0.24 [a]	10.0 ± 3.2 [a]
對照組 (堆肥)	21.7 ± 5.4 [b]	1.95 ± 0.22 [b]	8.0 ± 2.0 [a]

* 相同英文字母表示差異未達 5%顯著水準。

病害管理

小花蕙蘭病害的種類大致如下所列，生物因子引起的病害如病毒病、炭疽病、疫病、假球莖腐敗病、細斑病、黃斑病、灰黴病、白絹病、細菌性軟腐病、細菌性褐斑病等十種，而非生物因子引起的傷害有肥傷、藥害、日燒、根腐及生理性黃化等。傳統小花蕙蘭大多以分芽方式繁殖，其子代容易隨母株帶病繁殖而傳染，感病植株若顯現嚴重病徵便失去商品價值，本文針對病毒病與真菌性病害進行討論。

一、病毒病 (Viral disease)

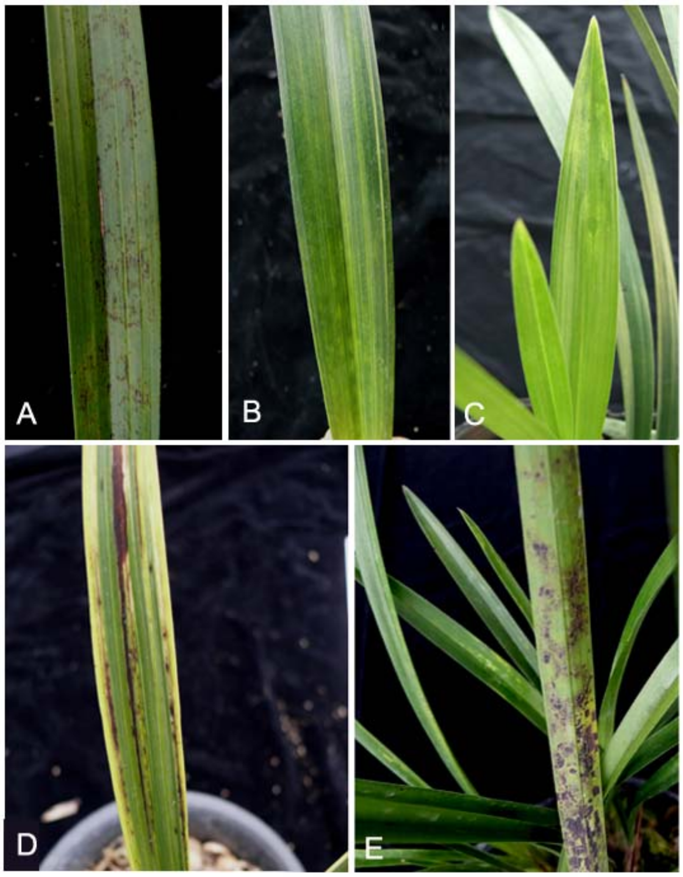
病毒病的發生目前仍無有效的藥劑可以防治，因此「預防重於治療」是目前對於病毒病防治的主要概念。傳統小花蕙蘭以無性分芽繁殖方式為主，多由蘭農自行留存母株繁殖，若母本帶病毒就能傳染子代，或是藉由操作器械及人員傳播到其他植株，造成蘭園中植株之生長勢弱並產生病徵，影響品質與價格。小花蕙蘭進行母本與種苗的病毒檢定，可防範病毒藉由繁殖過程而大量傳播，影響植株生長與商品價值。目前報導感染蕙蘭屬蘭花 (*Cymbidium* spp.) 的病毒種類，包括康乃馨斑駁病毒 (*Carnation mottle virus*, CarMV)、蕙蘭 (東亞蘭) 嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*, CymMV)、東亞蘭黃化嵌紋病毒 (*Cymbidium chlorotic mosaic virus*，CymCMV)、東亞蘭微嵌紋病毒 (*Cymbidium mild mosaic virus*，CymMMV)、東亞蘭輪點病毒 (*Cymbidium ringspot virus*, CyRSV)、齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)、蘭花斑點病毒 (*Orchid fleck virus*，OFV)、煙草嵌紋病毒蘭花分離株 (*Tobacco mosaic virus* orchid strain, TMV-orchid)、蕃茄輪點病毒 (*Tomato ringspot virus*, TomRSV)、蕪菁嵌紋病毒 (*Turnip mosaic virus*，TuMV) 等 10 種；其中，CymMV 與 ORSV 是目前蘭花普遍發生的病毒，對其產業經濟影響最深者，是國際間對於蘭花栽培高度共識需加強防患的兩種病毒，也是臺灣在文心蘭與蝴蝶蘭健康種苗驗證制度規範須檢定的病毒種類。

受到 CymMV 感染之小花蕙蘭植株，常見葉片出現黑色壞疽斑點或壞疽條紋等病徵 (圖四 A)。壞疽斑有時只出現於葉片下表面。部份小花蕙蘭會產生黃綠斑駁之嵌紋 (mosaic) 或黃化條斑型 (chlorotic streak) 病徵 (圖四 B)。但病徵之表現與品種之特性有關，有些品種雖然感染並不會在每一芽上表現病徵，有時僅在少數芽體上出現，或者隔代出現。另外比較粗壯的品種例如山川報歲或金華山等，縱使感染病毒只要栽培環境良好，施肥適當，其病徵通常極為輕微不易肉眼辨識。同一植株受 CymMV 與 ORSV 複合感染時，對病徵有加乘效應 (synergistic effect)，病徵會遠比單獨感染時嚴重許多 (圖四 D、四 E)；部份蘭花種類感染病毒後並不表現任何病徵。CymMV 主要藉由機械性傷口感染，可經由病株汁液、操作器具、重覆使用之質材或栽培過病株的盆缽與植株間的接觸而傳播，可在細胞外長期存活而污染栽培作業環境，然後再藉由機械性傷口傳染至健康蘭株；目前尚未發現有媒介昆蟲可傳播此病毒。

ORSV 感染蘭科植株後造成之病徵包括有輪斑 (ringspot)、嵌紋 (mosaic)、斑紋 (mottle)、黃化條紋 (chlorotic streak)、花色條斑 (color breaking)及壞疽型 (necrosis) 等均有記錄，有些蘭花品系感染 ORSV 後並不表現病徵。小花蕙蘭普遍發生 ORSV，多數品系在新分芽的幼葉上可見明顯之嵌紋或條斑病徵 (圖四 C)，也有發生褐色輪斑者，不同蕙蘭種類產生之病徵會有差異，有些品系亦不會形成病徵。ORSV 耐熱性強達 95℃的溫度，寄主細胞外性質比 CymMV 穩定很多，可存活的時間較久，為穩定性極高的植物病毒。ORSV 主要透過機械性傷口

方式傳播，可經由被病毒污染的器具、栽培盆缽或操作人員而散播，因此整個生產過程中包括組織培養流程所可能造成組織傷口的操作或栽培過程中對植株的修剪、切花等都可能傳播病毒，甚至植株間的碰觸或摩擦，都可能是病毒的傳染途徑；目前也尚未發現有媒介昆蟲可傳播此病毒。

植物病毒檢定技術包括：病徵目視診斷法、指示植物接種生物檢定法、病毒內含體顯微鏡觀察診斷法、電子顯微鏡觀察技術、血清檢定與核酸檢測技術。目前針對蘭花病毒檢測技術主要方法為抗血清檢定技術-酵素連結免疫吸附反應 (Enzyme-linked immunosobent assay, ELISA)、反轉錄-核酸聚合脢連鎖反應 (Reverse transcription- polymerase chain reaction, RT-PCR) 及生物晶片檢測 (DNA bio-chip)。ELISA 技術因操作方便，適用於大量樣品之病毒檢測，加上結果之再現性與穩定性均深獲各界肯定，因此，已於種苗業界廣泛使用。RT-PCR 係針對病毒核酸分子進行檢測，因此較 ELISA 技術更敏感。目前文心蘭與蝴蝶蘭之蘭花種苗驗證規範中均以 ELISA 及 RT-PCR 技術進行病毒檢定。高敏感且實用化之病毒檢測技術對於無病毒小花蕙蘭組培苗量產與栽培品質提昇，有其實質之正面助益。本團隊研究結果顯示，目前小花蕙蘭僅發現喜姆比蘭嵌紋病毒 (CymMV) 及齒舌蘭輪斑病毒 (ORSV) 的感染，本團隊已可利用血清與生物晶片 (Biochip) 進行小花蕙蘭病毒之檢測 (圖五)。



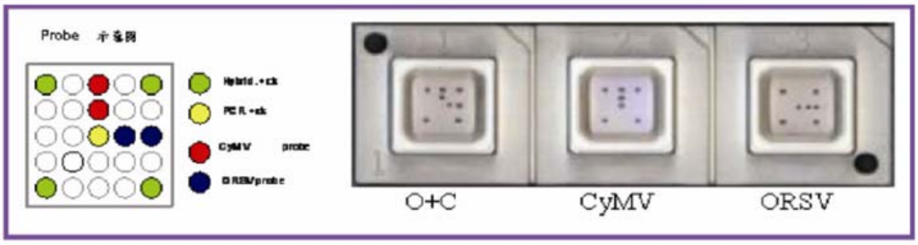
圖四、小花蕙蘭 (四季蘭-錦旗) 病毒性病徵。受 CymMV 感染之小花蕙蘭植株，葉片出現黑色壞疽斑點或壞疽條紋 (A)、黃綠斑駁嵌紋 (B) 病徵；ORSV 感染植株，在新分芽的幼葉上可見明顯之嵌紋或條斑病徵 (C)；同一植株受 CymMV 與 ORSV 複合感染時，呈現嚴重型病徵 (D, E)。

ELISA 法

病毒檢測	ELISA 法之病毒檢出率（正反應株 / 總株數）x 100%		
	O*	C	O + C
檢出率	64.6%	31.0%	17.7%
檢出數	223	107	61
檢測總數	345	345	345

* O, ORSV；C, CymMV；O + C, ORSV 與 CymMV 複合感染

生物晶片法



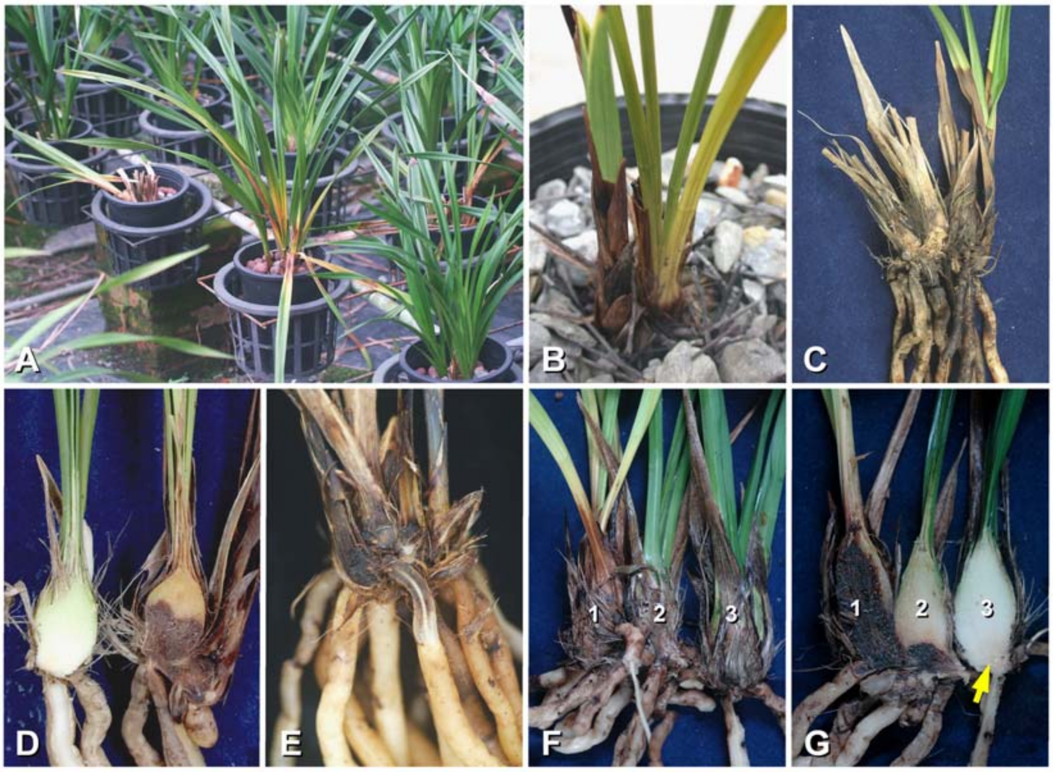
圖五、小花蕙蘭病毒病調查及利用 ELISA 和生物晶片法進行病毒檢測。

二、真菌性病害

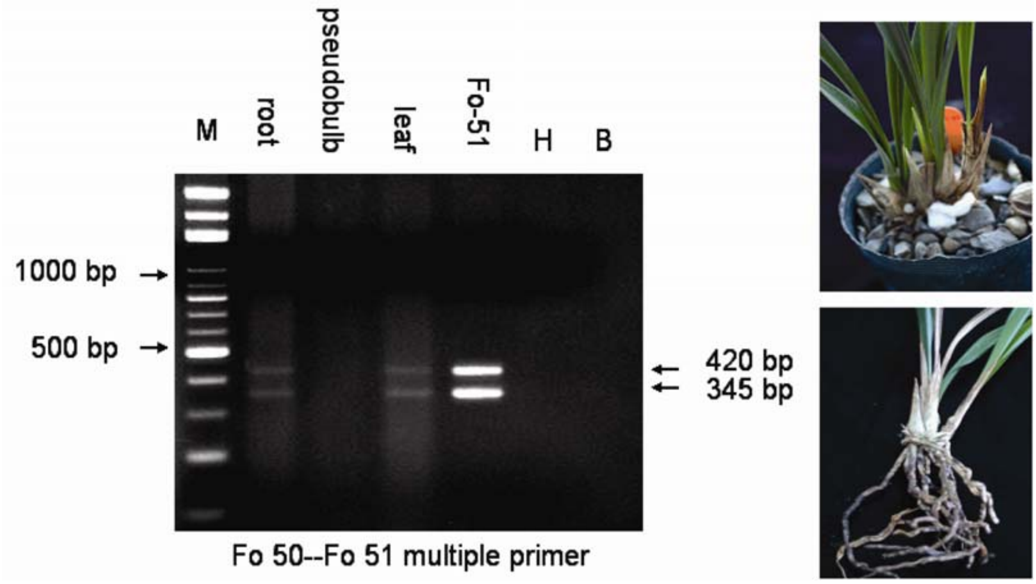
引起小花蕙蘭真菌性病害的病原有灰黴病菌 (*Botrytis cinerea*)、炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、疫病菌 (*Phytophthora palmivora*、*P. parasitica*)、細斑病 (*Fusarium moniliforme*)、黃斑病 (*Cercospora sp.*)及白絹病 (*Sclerotium rolfsii*)等，上述病原僅有疫病菌可造成假球莖腐敗的病徵；近年來蕙蘭上發現由尖鐮孢菌 (*Fusarium oxysporum* sp.) 所引起之假球腐敗病，感染後通常造成萎凋或根腐而成為最普遍而致命的新病害 (圖四)；假球腐敗病之病原菌可藉由假球莖傳播，具有寄主專一性，僅能危害蕙蘭屬蘭花，而主要的傳播途徑為種苗帶菌，為小花蕙蘭栽培主要限制因子之一，病原菌若選用健康種苗則能大幅降低此病害(表五)。本團隊研究結果顯示，尖鐮孢菌病原檢測可利用一組逢機引子對所設計可增幅已知蕙蘭基腐病菌的多型性片段中進行次選殖 560 bp 片段，利用設計所得 Fo50 引子對可偵測到罹病部位分離純化菌株之 345bp 預期片段，用以評估病原菌感染情形 (圖六、圖七)。

本團隊針對小花蕙蘭主要真菌性病害亦已建立管理與防治模式如下所述：

1. 炭疽病防治法：加強栽培管理，維持合理之生長空間，使葉片不致重疊，陽光照射充足，通風良好，減少病原菌繁衍機會。適當施用有機質肥料，增進植株之抵抗力，同時提高開花品質。早期加強藥劑防治。防治本病除加強蘭園管理外，可同時參考採用25%「撲克拉」乳劑2,500倍、50%「撲克拉錳」可濕性粉劑6,000倍、70%「甲基鋅乃浦」可濕性粉劑500倍及62.25%鋅錳邁克尼可濕性粉劑600倍。
2. 疫病防治法：由*Phytophthora* spp.引起的疫病，在多濕的條件下容易發生，因此避免栽培介質排水不良，少用噴灌方式給水，亦可減輕此類病害的發生，亦



圖六、由鐮孢菌 (*Fusarium oxysporum*) 引起之蕙蘭假球莖腐敗病。罹病植株黃葉、落葉、根腐、幼芽基部褐化 (A、B、C)；假球莖內部呈現褐化腐敗 (D，左為健株)、根內部呈現褐化腐敗 (E)；F、G：病株 (植株1) 莖基部的病原菌會傳至鄰苗，雖外觀無病徵但假球莖已出現腐敗 (植株2)，甚至傳至隔苗，雖未見葉部及假球莖內部病徵 (植株3)，但以培養基分離檢測結果已受病菌感染 (箭頭所指之處)。



圖七、小花蕙蘭假球莖腐敗病病徵與PCR檢測方法之建立。

表五、小花蕙蘭假球莖腐敗病病原菌來源與其對病害之影響

材料來源	材　　料	分離率 (%)	繁殖體量 (p/g substrate)	分芽種植發病率 (%)
病株盆	病株 N	100	—	100
	病株鄰苗 N1	92	—	100
	病株隔苗 N2	54	—	72
	病株再隔苗 N3	32	—	48
	介質	100	3.6×10^3	—
無病株盆	無病徵株	10	—	16
	介質	35	2.2×10^2	—
組培苗	組培苗	0	—	0
	新介質	0	0	—
園區	園內塵土	—	1.5×10^3	—
	澆灌水	—	0	—

可定期噴施亞磷酸與氫氧化鉀各稀釋1000倍混合液使用，預防效果非常良好。另外可於雨季前與病害初期加施1-2次農藥，如66.5%「普拔克」溶液1000倍或58%「鋅錳滅達樂」混合可濕性粉劑400倍，亦有優異的防病效果。噴藥後則應停止噴水5~7天，以免影響藥效。

3. 假球莖腐敗病 (Basal rot or pseudobulb rot) 防治法：(1) 少自他場購入種苗：國蘭栽培業者常自他場購入種苗，因而常自他處引入病原菌，一旦病原菌於國蘭園內建立起族群後，就幾乎無法將它們完全除滅。若必需向他場購苗時，需到現場觀察園區內是否有假球莖腐敗病的植株，若發病嚴重的園區或準備淘汰的殘株千萬別貪小便宜去購買，所謂請神容易送神難，因為發生病害的園區內即使是外表無病徵之國蘭植株也有帶菌的可能性，寧可多花錢購買園內無病而植株健康的國蘭苗。(2) 健壯母株之選育：栽培過程中，健康而生長勢佳者應優先選為母株，而不是將優良的種苗賣出，留下較差的植株想以栽培技術來增進生長勢，因為留下較差的種苗想要照顧到生長優良，常常事與願違，寧可將部分優良的種苗留下當母本，而較差的蘭苗則隔離栽培觀察，或乾脆焚燬。(3) 病株移除：為杜絕基腐病擴散最重要的方法。一般栽培者常為避免浪費而將盆內病芽去除，留下旁鄰外表看似健康的幼苗繼續栽培繁殖，殊不知此動作不僅不節省反而耗費成本更大，因為病芽鄰苗假球莖及根帶菌率極高，且發病率常達70%以上，並提供病原菌繁殖傳播的機會，很難以化學藥劑將植株體內的鐮孢病菌除滅，故盆內只要有一芽發病則需全盆清除植株燒燬。若要清除更徹底，則換盆或分株時，將根腐嚴重的植株去除，更能確保爾後的國蘭存活率。(4) 栽培環境：成功的國蘭栽培者其園區清潔無雜物，特別是病株、病葉一定立即移除，床架下無殘株破缽，並常消毒輪空床架 (如藥劑或漂白水、消毒水)，園區外也不會堆積殘株。介質勿重複使用，若需再利用時，則應以蒸汽

消毒後使用；盆缽也最好使用丟棄式，若為陶瓷材質則需經消毒完全後使用。(5) 分株：分株時於假球莖、根部、葉片造成的傷口是病原菌侵入的主要位置，故分株後需於假球莖傷口處，及去根而於基部產生的傷口塗抹或噴佈農藥，並陰乾後才種植。(6) 施用農藥：如25%撲克拉乳劑、50%撲克拉錳可濕性粉劑、53%腐絕快得寧可濕性粉劑、25%免賴得可濕性粉等，故可利用來分株時塗料(濃度以不造成藥害為原則)，及高溫多雨時噴佈於葉片。(7) 使用組織培養苗：種苗帶菌為本病害最重要的感染源，若能栽培不帶病菌之健康組培苗，再加上設施栽培管理，可避免本病之感染。

4. 細斑病 (Fusarium leaf spot) 防治法：避免於抽芽季節施用有機質肥料，藥劑防治同萎凋病之防治法。
5. 黃斑病 (Cercospora leaf spot) 防治法：蘭園中的病葉落葉是病原菌產生的溫床，亦盡量清除，每年發病期施予藥劑防治，75%四氯異苯晴可濕性粉劑500倍與56%貝芬硫醌可濕性粉劑1000倍都能有效防治本病害。
6. 灰黴病 (Gray mold) 防治法：防治本病首重蘭園的清園管理工作，開花期間一旦發現病徵後，應立即清除花器，避免過度噴灌給水，或改以滴灌設施供水可有效減輕本病發生。另外溫室可覆蓋吸收近紫外光材質的塑膠布，以降低病原菌的產孢，抑制二次感染的機會。藥劑防治方面，目前正式推薦於本病防治的藥劑為78%「甲基多保淨」可濕性粉劑2,500倍，另外可嘗試使用50%「依普同」可濕性粉劑1,500倍及50%「撲滅寧」可濕性粉劑2,000倍等，均對本病有優良的防治效果。由於，本菌容易產生抗藥性，藥劑應輪流使用，以確保防治效果。

結　　語

小花蕙蘭 (國蘭) 的組織培養向來是以根莖形成芽體的路徑達成量產目的，而根莖來源主要是由未熟胚無菌播種產生，或是經由側芽培養而來。本團隊已建立數種小花蕙蘭 (四季蘭-玉華、四季蘭-金荷、報歲蘭-中斑藝類與報歲蘭-桑原晃) 的組培微體繁殖與出瓶馴化技術。然而因為小花蕙蘭之組織培養受限於材料量少、培養期長及出芽不整齊等因素，造成產業化量產瓶頸，在技術上仍有不少改進空間。此外，蘭農一般認為組培苗養成時間太長，以致種植意願不高，因此本團隊亦針對組培苗的養液肥培技術進行相關研究，期能縮短其出瓶至成苗的栽培時間。本團隊對於小花蕙蘭重要病害之檢測技術與管理方法均有研究成果；此外，初步觀察顯示防雨設施可降低蘭株罹病率，因而降低雨季之農藥使用量及頻度；然而蘭農認為防雨設施在管理制度與傳統方式差異極大，導致其改變防雨設施栽培之意願不高，此部分仍須研究單位深入研發，增加蘭農改善設施之意願，以提升小花蕙蘭外銷成株之品質。除了應用組培大量繁殖技術解決種苗限制瓶頸外，其他諸如優質種苗繁殖與栽培標準作業流程、商品標準化體系制定以及大規模生產時之成本規劃等等，都是需要考慮的重要問題。本團隊擬整合小花

蕙蘭組培苗繁殖與養成技術及病害檢測與管理技術，建構符合外銷需求小花蕙蘭之健康種苗的供應體系，若是能再配合育種家、蘭農與貿易商的獨到眼光，量產優質種苗供給蘭農栽種，生產符合外銷需求成株產品，建立嶄新且可實際運作之外銷小花蕙蘭生產模式，創造小花蕙蘭產業的另一個高峰。

參考文獻

李哖。1993。國蘭類無菌繁殖技術。園藝作物組織培養研究與應用技術手冊。第81-93頁。種苗改良繁殖場。臺中。

林毓雯、劉滄棽、王鐘和。2003。有機資材氮礦化特性研究。中華農業研究，52：178-190。

邱金春。1992。國蘭的組織培養繁殖。園藝作物組織培養實用技術。第 42-48 頁。豐年社。臺北。

張清安。1998。植物病毒個論(一)蘭花病毒。農業世界 137: 14-20。

張清安。2001。病毒病害。p.57-74 植物保護圖鑑系列-洋蘭保護。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局出版。127 pp。

張清安。2005。植物保護技術專刊系列 1-蘭花病毒病。62 pp。張清安編著。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局出版。

張清安、李紅曦、陳金枝、林玫珠、王昭萍。2003。臺灣文心蘭種苗病毒驗證制度之研擬與展望。植物病理學會刊 12：141-148.

張清安。2007。蘭花病毒檢測技術發展現況。農科新世紀 8：22-28。

莊琮亮，張家禎，林啟萬。2007。動植物快速檢測診斷晶片與研發趨勢。農科新世紀 8：41-48。

許文章。1993。報歲蘭利用根莖組織培養大量繁殖技術。園藝作物組織培養研究與應用技術手冊。第94-98頁。種苗改良繁殖場。臺中。

蔡淳瑩。1999。國蘭栽培介質及肥培管理技術。花蓮區農業專訊，29：2-4。

Abd-Elsalam, K., A. Ibrahim, N. Aly, M. A. Abdel-Satar, M. S. Khalil, and J. A. Verreet. 2003. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. African Journal of Biotechnology 2: 82-85.

Alves-Santos, F. M., B. Ramos, M. A. García-Sánchez, A. P. Eslava, and J. M. Díaz-Mínguez. 2002. A DNA-Based Procedure for In Planta Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Phytopathology 92: 237-244.

Bentley, S., K. G. Pegg, and J. L. Dale. 1995. Genetic variation among a worldwide collection of isolates of *Fusarium oxysporu*m f. sp. *cubense* analyzed by RAPD-PCR fingerprinting. Mycol. Res. 99: 1378-1384.

Chang, C. and W. C. Chang. 2000a. Micropropagation of *Cymbidium ensifolium* var misericors through callus-derived rhizomes. *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant 36: 517-520.

Chang, C. and W. C. Chang. 2000b. Effect of thidiazuron on bud development of *Cymbidium sinense* Wild *in vitro*. Plant Growth Regul. 30: 171-175.

Chang, C. and W. C. Chang. 1998. Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*. Plant Cell Rep. 17:251-255.

Chen, Y. Q., X. Liu, and Y. Liu. 2005. *In vitro* plant regeneration from the immature seeds of *Cymbidium faberi*. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 81: 247-251.

Duff, J. and A. Daly. 2002. Orchid diseases in the Northern Territory. Plant Pathologist 13: 1-5.

Ewdardson, J. R. and F. W. Zettler. 1988. Odontoglossum ringspot virus. P. 233-247. *In*: The Plant Viruses. Vol. 2. (Van Regenmortel, M. H. V., and Fraenkel-Conrat, H. eds). Plenum Publishing Corporation, New York, USA.

Hasegawa, A., H. Ohashi, and M. Goi. 1985. Effect of BA, rhizome length, mechanical treatment and liquid shaking culture on the shoot formation from rhizome in *Cymbidium faberi* Rolfe. Acta. Horti. 166: 25-40.

Inouye, N. 1983. Host range and properties of a strain of odontoglossum ringspot virus in Japan. Nogaku Kenkyu 60: 53-67.

Lee, B. D., W. G. Kim, W. D. Cho, and J. M. Sung. 2002. Occurrence of dry rot on *Cymbidium* orchids caused by *Fusarium* spp. in Korea. Plant Pathol. J. 18: 156-160.

Martin, N. A. and P. J. Workman. 1998. *Cymbidium* orchids- a survey of pest and disease control. DSIR Entomology Division Report 32pp.

Mohmed, A., M. Abdel-Satar, S. Khalil, I. N. Mohmed, K. A. Abd-Elsalam, and J. A. Verreet. 2003. Molecular phylogeny of *Fusarium* species by AFLP fingerprint. African Journal of Biotechnology 2: 51-55.

Paek, K. Y. and E. C. Yeung. 1991 The effects of α-naphthaleneacetic acid and N6-benzyladenine on the growth of *Cymbidium forrestii* rhizomes *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 24: 65-71.

Paul, H. L. 1975. Odontoglossum ringspot virus. CMI/AAB. Description of Plant Viruses, No. 155.

Peak, K. Y. and T. Kozai. 1998. Micropropagation of temperate *Cymbidium* via rhizome culture. HortTechnology. 8: 283-288.

Resh, H. M. 1985. Hydroponic Food Production. Woodbridge Press Publish Company, Santa Barbara, California 93160. 462pp.

Shimasaki, K., J. Tsuneishi, and Y. Fukumoto. 2001. Organogenesis and ecological differentiation of *Cymbidium* species. Acta Hort. 560: 485-488.

Zettler, F. W., N. J. Ko, G. C. Wisler, M. S. Elliot, and S. M. Wond. 1990. Viruses of orchids and their control. Plant Dis. 74: 621-626.

Establishment of High-Quality Plantlet Production System for Chinese Cymbidium

Uei-Chern Chen[1], Jin-Hsing Huang[2], Yu-Wen Lin[3], Chi-Cheng Chen[4], Chin-Chih Chen[2], Hsin-Der Shih[2], Chin-Yi Tsao[1], Chi-Ni Hsia[1], and Ting-Fang Hsieh[5]

Abstract

Chinese Cymbidium has reached annual production of 2-3 hundred million NTD ranked only after the *Phalanopsis* flower industry. The main exporting countries are South Korea, Japan, Singapore and Hong Kong with low-price products. Although Chinese Cymbidium productivity has been fast expanded in recent years, selling products were insufficient due to lower acceptable rates. Three reasons were concluded for the upper mentioned problem, 1. Plantlet propagation rate through shoot dividing method was quite low. 2. Two major virus, *Cymbidium mosaic virus* (CymMV), *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), and one fungus pathogen-pseudobulb decayed disease (*Fusarium oxysporum*), are found in Chinese Cymbidium which could spread with reproduced plantlets and leading to serious cultivation problems. 3. Ordinarily, Chinese Cymbidium is cultivated under the double-layers sunshade net system which may cause active fungus disease because of lacking of rainfall prevention. In order to overcome these drawbacks and to obtain healthy cloned plants for industry cultivation and for exporting high quality products, it is very essential to establish the *in vitro* masspropagation system to provide disease-free plantlets and to have disease detection techniques for Chinese Cymbidium industry. So for, our team has developed *in vitro* micropropagation and *ex vitro* acclimation system as well as fertilization applications on *Cymbidium ensifolium* and *Cymbidium sinense* plantlet production. In addition to ELISA and biochip detection methods for CymMV and ORSV, a RT-PCR method for detecting *F. oxysporum* were also established. Our results showed that using healthy plantlets derived from micropropagation could reduce disease spreading and methods for disease detection are very beneficial for Chinese Cymbidium industry. Subjects to follow up are: 1) The techniques of micropropagation and plantlet cultivation system,

[1] Biotechnology Division, Agricultural Research Institute; Correspondence author, E-mail: UCCChen@tari.gov.tw
[2] Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute
[3] Agricultural Chemistry Division, Agricultural Research Institute
[4] Lanyang Branch Station, Hualien District Agricultural Research and Extension Station
[5] Floriculture Research Center, Agricultural Research Institute

2) Improvement of cultivation and disease management, 3) The healthy plantlet production and supplement system. The optimal goal for this study is to combine with the unique vision of breeders, farmers and traders to establish a new and efficient operation system for production of healthy plantlets. The entire system will not only supply healthy plantlets for farmers but also provide cultivation system to produce high quality Chinese Cymbidium plants for exporting purpose.

Key words: Chinese Cymbidium, tissue culture, fertilization management, disease detection, Healthy plantlet